

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON

#9

Date of mailing (day/month/year) 13 July 2000 (13.07.00)		
Applicant's or agent's file reference 2587WOOP		IMPORTANT INFORMATION
International application No. PCT/JP00/00024	International filing date (day/month/year) 06 January 2000 (06.01.00)	Priority date (day/month/year) 07 January 1999 (07.01.99)
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW
EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
National : AU, BG, BR, CA, CN, CZ, IL, JP, KR, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SK, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM
OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG
National : AE, AL, AM, AZ, BA, BB, BY, CR, CU, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IN, IS, KG, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MX, SG, SI, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UZ, VN, YU, ZA

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: <p style="text-align: center;">J. Zahra</p>
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

15

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON

#10



Date of mailing (day/month/year) 13 July 2000 (13.07.00)		
Applicant's or agent's file reference 2587WO0P		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP00/00024	International filing date (day/month/year) 06 January 2000 (06.01.00)	Priority date (day/month/year) 07 January 1999 (07.01.99)
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU,CN,JP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
AE,AL,AM,AP,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CR,CU,CZ,DM,EA,EE,EP,GD,GE,HR,HU,ID,IL,IN,IS,KG,
KZ,LC,LK,LR,LT,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MX,NO,NZ,OA,PL,RO,RU,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,
UA,UZ,VN,YU,ZA
The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on:
13 July 2000 (13.07.00) under No. WO 00/40610

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C07K 14/47, C12P 21/02, C12N 15/12 // (C12P 21/02, C12R 1:19)</p>	<p>AI</p>	<p>(11) 国際公開番号 #11 WO00/40610</p> <p>(43) 国際公開日 2000年7月13日(13.07.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00024</p> <p>(22) 国際出願日 2000年1月6日(06.01.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/1840 1999年1月7日(07.01.99) JP 特願平11/4426 1999年1月11日(11.01.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)(JP/JP) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 伊藤隆司(ITO, Takashi)(JP/JP) 〒658-0032 兵庫県神戸市東灘区向洋町中1丁目10番地 101-2003号 Hyogo, (JP) 田中葉子(TANAKA, Yoko)(JP/JP) 〒610-0331 京都府京田辺市田辺勇田80-50 Kyoto, (JP) 改正知子(KAISHO, Tomoko)(JP/JP) 〒532-0013 大阪府大阪市淀川区木川西4丁目4番16-507 Osaka, (JP)</p>	<p>西村 紀(NISHIMURA, Osamu)(JP/JP) 〒305-0812 茨城県つくば市大字東平塚586番地2 Ibaraki, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 高橋秀一, 外(TAKAHASHI, Shuichi et al.) 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: PROCESS FOR PRODUCING ACTIVATED PROTEIN</p> <p>(54)発明の名称 活性化蛋白質の製造法</p> <p>(57) Abstract A process for activating a purified polypeptide containing an amino acid sequence which is identical or substantially identical with the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, characterized by bringing the polypeptide into contact with copper ion, calcium ion or magnesium ion or a substance capable of supplying copper ion, a substance capable of supplying calcium ion or a substance capable of supplying magnesium ion, etc. The activation method or production method makes it possible to economically produce activated MPIF-1Δ23 in a large amount which protects bone marrow stem cells from chemotherapeutics for cancer and exerts an effect of quickly recovering a decrease in leukocytes serving as the limiting factor in the administration of anticancer agents.</p>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00024

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K14/47, C12P21/02, C12N15/12
 //(C12P21/02, C12R1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K14/47, C12P21/02, C12N15/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 SwissProt/PIR/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO, 98/14582, A (GENOME SCIENCES, INC.), 09 April, 1998 (09.04.98) & EP, 941330, A1	10 /1-9
Y	JP, 9-262093, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 07 October, 1997 (07.10.97) (Family: none)	1-10
Y ✓	EP, 586872, A1 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH), 16 March, 1994 (16.03.94) & US, 5434067, A & JP, 6-153938, A	1-10
PY	JP, 11-266865, A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 05 October, 1999 (05.10.99) (Family: none)	1-10
A ✓	WO, 92/09623, A1 (ROUSSEL-UCLAF), 11 June, 1992 (11.06.92) & EP, 511964, A1 & US, 5252708, A & JP, 5-503004, A	1-10
A ✓	JP, 7-147992, A (Kobe Steel, Ltd.), 13 June, 1995 (13.06.95) (Family: none)	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 30 March, 2000 (30.03.00)	Date of mailing of the international search report 11 April, 2000 (11.04.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

P C T

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 2587WOOP	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/00024	国際出願日 (日.月.年) 06.01.00	優先日 (日.月.年) 07.01.99
出願人(氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☒ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C07K14/47, C12P21/02, C12N15/12
// (C12P21/02, C12R1:19)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ C07K14/47, C12P21/02, C12N15/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
SwissProt/PIR/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	WO, 98/14582, A (GENOME SCIENCES, INC.) 9. 4月. 1998 (09. 04. 98) & EP, 941330, A1	10 / 1-9
Y	JP, 9-262093, A (武田薬品工業株式会社) 7. 10月. 1997 (07. 10. 97) ファミリーなし	1-10
Y	EP, 586872, A1 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 16. 3月. 1994 (16. 03. 94) & US, 5434067, A & JP, 6-153938, A	1-10
P Y	JP, 11-266865, A (積水化学工業株式会社) 5. 10月. 1999 (05. 10. 99) ファミリーなし	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 03. 00

国際調査報告の発送日

11.04.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一



4N 9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 92/09623, A1 (ROUSSEL-UCLAF) 11. 6月. 1992 (11. 06. 92) & EP, 511964, A1 & US, 5252708, A & JP, 5-503004, A	1-10
A	JP, 7-147992, A (株式会社神戸製鋼所) 13. 6月. 1995 (13. 06. 95) ファミリーなし	1-10



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 C07K 14/47, C12P 21/02, C12N 15/12 // (C12P 21/02, C12R 1:19)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/40610</p> <p>(43) 国際公開日 2000年7月13日(13.07.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00024</p> <p>(22) 国際出願日 2000年1月6日(06.01.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/1840 1999年1月7日(07.01.99) JP 特願平11/4426 1999年1月11日(11.01.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)(JP/JP) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 伊藤隆司(ITO, Takashi)(JP/JP) 〒658-0032 兵庫県神戸市東灘区向洋町中1丁目10番地 101-2003号 Hyogo, (JP)</p> <p>田中葉子(TANAKA, Yoko)(JP/JP) 〒610-0331 京都府京田辺市田辺勇田80-50 Kyoto, (JP)</p> <p>改正知子(KAISHO, Tomoko)(JP/JP) 〒532-0013 大阪府大阪市淀川区木川西4丁目4番16-507 Osaka, (JP)</p>	<p>西村 紀(NISHIMURA, Osamu)(JP/JP) 〒305-0812 茨城県つくば市大字東平塚586番地2 Ibaraki, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 高橋秀一, 外(TAKAHASHI, Shuichi et al.) 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: PROCESS FOR PRODUCING ACTIVATED PROTEIN</p> <p>(54)発明の名称 活性化蛋白質の製造法</p> <p>(57) Abstract A process for activating a purified polypeptide containing an amino acid sequence which is identical or substantially identical with the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1, characterized by bringing the polypeptide into contact with copper ion, calcium ion or magnesium ion or a substance capable of supplying copper ion, a substance capable of supplying calcium ion or a substance capable of supplying magnesium ion, etc. The activation method or production method makes it possible to economically produce activated MPIF-1Δ23 in a large amount which protects bone marrow stem cells from chemotherapeutics for cancer and exerts an effect of quickly recovering a decrease in leukocytes serving as the limiting factor in the administration of anticancer agents.</p>		

(57)要約

本発明は精製された配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドと銅イオン、カルシウムイオン若しくはマグネシウムイオンまたは銅イオン供給物質、カルシウムイオン供給物質若しくはマグネシウムイオン供給物質とを接触させることを特徴とする該ポリペプチドの活性化方法などに関する。

本発明の活性化方法または製造法は、癌化学療法剤から骨髄幹細胞を保護し、抗ガン剤投与時のリミティングファクターである白血球の減少を速やかに回復させる効果を有する活性型MP1F-1Δ23を、大量かつ安価に製造することを可能にする。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	YU	ユーゴスラヴィア
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	ZA	南アフリカ共和国
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー		
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュー・ジーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

活性化蛋白質の製造法

技術分野

- 5 本発明は大腸菌を用いた遺伝子組み換え法によるポリペプチドの活性化方法、大腸菌を用いた遺伝子組み換え法による活性型ポリペプチドケモカインの製造方法などに関するものである。

背景技術

- 10 組み換え蛋白（ポリペプチド）の生産にはコスト等の面から大腸菌が最も広く用いられているが、大腸菌で発現を行った場合、封入体を形成したり、正確なS-S結合が生じないために、蛋白としては得られても活性が認められない場合がある。大腸菌を用いて活性体を得る方法としては、分泌シグナルを付加することによりペリプラズム空間に可溶体として蓄積せしめ、活性体を取得する
- 15 方法がある（C. N. Changeら、Gene、189-196、55(1987)）。

- 一方、大腸菌で封入体として発現せしめることは、高い生産量及び封入体では目的蛋白が高い純度で得られる利点がある。しかし、封入体より活性体を取得するためには、封入体の変成剤による可溶化及び変成剤の除去を含むリフォールディングの過程を必要とする（R. H. Pain編、タンパク質のフォールディング、245-279(1995)、シュプリンガーフェアラーク東京）。このリフォールディングの操作においては、レドックス緩衝液系の使用、尿素やアルギニン塩酸塩等の沈殿防止剤を用いる事により、リフォールディングの効率が高まる事が報告されている。しかしながらこれらの条件は目的とする蛋白（ポリペプチド）により大きく異なり、一般的なりフォールディング法によっては活性体が得ら
- 20 れない場合も多く存在する。
- 25 組み換え蛋白（ポリペプチド）の生産において、より簡便で確実な活性体の

- 取得方法の確立が期待されている。MPIF-1Δ23 (WO 95/17092号)は骨髓幹細胞コロニー形成の阻止作用を有することから、癌化学療法剤から骨髓幹細胞を保護し、抗ガン剤投与時のリミティングファクターである白血球の減少を速やかに回復させる効果が期待される。そのような医薬品としてMPIF-1Δ23を用いる場合には、大量かつ安価に活性型MPIF-1Δ23が得られる調製法の確立が必要となる。

発明の開示

- 本発明者らは、CCケモカインの一種であるMPIF (Myeloid Progenitor Inhibitory Factor) -1Δ23の活性体を効率よく取得する方法について種々の検討を行った結果、MPIF-1Δ23を銅、カルシウムまたはマグネシウム処理することによって可能となることを見出した。

すなわち、本発明は、

- (1) 精製された配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドと銅イオン、カルシウムイオン若しくはマグネシウムイオンまたは銅イオン供給物質、カルシウムイオン供給物質若しくはマグネシウムイオン供給物質とを接触させることを特徴とする該ポリペプチドの活性化方法、
- (2) 銅イオン供給物質が銅、硫酸銅、臭化銅、ふっ化銅、砒酸銅、塩化銅、
- (3) 銅イオン供給物質が硫酸銅である上記(1)記載の方法、
- (4) カルシウムイオン供給物質が、カルシウム、硫酸カルシウム、酢酸カルシウム、硝酸カルシウム、ギ酸カルシウムまたは塩化カルシウムである上記(1)記載の方法、
- (5) カルシウムイオン供給物質が塩化カルシウムである上記(4)記載の方法、

(6) マグネシウムイオン供給物質が、マグネシウム、硫酸マグネシウム、酢酸マグネシウム、硝酸マグネシウム、ギ酸マグネシウムまたは塩化マグネシウムである上記(1)記載の方法、

5 (7) マグネシウムイオン供給物質が硫酸マグネシウムである上記(6)記載の方法、

(8) 活性化されたポリペプチドの有する活性が細胞分化抑制活性である上記(1)記載の方法、

(9) 精製された配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドと銅イオン、カルシウムイオン若しくはマグネシウムイオンまたは銅イオン供給物質、カルシウムイオン供給物質若しくはマグネシウムイオン供給物質とを接触させることを特徴とする活性型ポリペプチドの製造方法、および

10

(10) 上記(1)記載の活性化方法によって活性化されたポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩などに関する。

15

図面の簡単な説明

図1は参考例2で調製したMPIF-1 Δ 23のSDS-PAGEの結果を示す電気泳動図を示す。

図2は実施例1で行われた硫酸銅処理によるMPIF-1 Δ 23の活性化を示す図を示す。

20

図3は実施例2で行われたDes-Met MPIF-1 Δ 23のマウス骨髄細胞分化抑制作用の測定結果を示す図を示す。

図4は実施例2で行われたDes-Met MPIF-1 Δ 23の細胞内カルシウム濃度の変化量を示す図を示す。

図5は実施例3で行われたMPIF-1 Δ 23のマウス骨髄細胞分化抑制作用の測定結果を示す図を示す。

25

発明を実施するための最良の形態

本発明の活性化方法または活性型ペプチドの製造方法に用いられるポリペプチド（以下、本発明のポリペプチドと略記する場合がある）としては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどがあげられる。

本発明のポリペプチドは、遺伝子組換え大腸菌に由来するポリペプチドであってもよく、また合成ポリペプチドであってもよい。

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドとしては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、本発明の活性化方法または製造法において活性化された結果、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列で表されるポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドなどが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、細胞分化抑制活性（例、骨髓細胞分化抑制活性など）などがあげられる。

実質的に同質の活性とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、細胞分化抑制活性などが同等（例、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度やポリペプチドの分子量などの量的要素は異なってもよい。

細胞分化抑制活性（例、骨髓細胞分化抑制活性など）の活性の測定は、自体

公知の方法（例えば、J. Exp. Med., 185, 1163-1172(1997)に記載の方法）に準じて行なうことができる。

活性化された本発明のポリペプチドとは、骨髓細胞分化抑制作用（特に後述の実施例に記載のマウス骨髓細胞分化抑制作用等）において、30%のLPP-CFCコロニー形成抑制率を示す用量が活性化前の本発明のポリペプチドに比べ1/5以下に、好ましくは1/20以下に低下している本発明のポリペプチドを示す。

また、本発明のポリペプチドとしては、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するポリペプチドなども用いられる。

本明細書におけるポリペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をはじめとする、本発明のポリペプチドは、C末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、

α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるビバロイルオキシメチル基などが用いられる。

- 5 本発明のポリペプチドがC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

- さらに、本発明のポリペプチドには、上記したポリペプチドにおいて、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、
10 ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどが用いられる。

- 20 本発明のポリペプチドは塩を形成していてもよく、本発明のポリペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。
25

以下に本発明のポリペプチドの活性化方法および活性型の本発明のポリペプ

チドの製造方法について詳述する。

本発明のポリペプチドを完全にコードするDNAのクローニングの手段として、本発明のポリペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、MutanTM-G (宝酒造 (株))、MutanTM-K (宝酒造 (株)) などを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化された本発明のポリペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のポリペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13

などが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーターなどが好ましい。

- 5 発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカーなどを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Ne

- 10 oと略称する場合がある、G418耐性）等があげられる。
このようにして構築された本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌などの細菌が用いられる。

- エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U
15 SA), 60巻, 160(1968)], JM103〔ヌクイレック・アシズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101〔ジャーナル・オブ
20 ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600〔ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954), MM294, MM294 (DE3)] などが用いられる。

- エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U
25 SA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことが

できる。

- 宿主がエシェリヒア属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば
- 5 、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子な
- 10 どを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

- エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー（Miller）、ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス（Journal of Experiments in Molecular Genetics）、431-433、Cold Spring Harbor Laboratory, New
- 15 York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

- 20 上記培養物から本発明のポリペプチドを分離・精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

- 本発明のポリペプチドを培養菌体から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポ
- 25 リペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100™などの界面活性

剤が含まれていてもよい。培養液中に本発明のポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

- このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるポリペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

- かくして得られる本発明のポリペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

- なお、組換え体が産生する本発明のポリペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼなどが用いられる。

- 抽出したポリペプチドの活性化を行うために、ポリペプチドのリフォールディングを行う。リフォールディングは、例えばタンパク質のフォールディング、R. H. Pain編、245-279 (1995)、シュプリンガーフェアラーク東京に記載された公知の方法あるいはそれに準じる方法により実施する事が可能である。抽出剤（例えば、グアニジン塩酸塩、尿素のようなカオトロピック可溶化剤、n-ラ

ウリルメチルグリシン、SDSのような界面活性剤など)を含まないもしくは低濃度の抽出剤を含む緩衝液で1段階もしくは他段階で希釈すること、半透膜を用いた透析、ゲル濾過を用いた緩衝液の置換等により行うことが出来る。この場合、ポリペプチドのアグリゲーションを防止するために、アルギニン、ポ
5 リエチレングリコール、中性界面活性剤等を添加することが出来る。ポリペプチドのジスルフィド結合形成のために空気酸化、酸化還元緩衝液系等を用いることが出来る。酸化還元緩衝液にはグルタチオン、システイン、ジチオスレイトール、2-メルカプトエタノール、またはシステアミンをベースとしたものが挙げられる。

- 10 本発明のポリペプチドは例えば、(1)上記の分離・精製後に、(2)リフォールディングの後に、(3)リフォールディングと同時に、または(5)ポリペプチドを菌体から抽出した後に、銅イオン、カルシウムイオン若しくはマグネシウムイオンまたは銅イオン供給物質供、カルシウムイオン給物質若しくはマグネシウムイオン供給物質と接触させる。また、この場合、銅イオン、カル
15 シウムイオン若しくはマグネシウムイオンまたは銅イオン供給物質供、カルシウムイオン給物質若しくはマグネシウムイオン供給物質の一種または二種以上と同時に接触させてもよい。

本明細書において「精製された本発明のポリペプチド」は上記の分離・精製法で精製された本発明のポリペプチド(純度:50%以上、好ましくは80%
20 以上、より好ましくは90%以上)に加えて、組換え体菌体から得られた粗抽出液や培養上清、上記の分離・精製法で得られた部分精製品も含む。

リフォールディング時に銅イオン、カルシウムイオン若しくはマグネシウムイオンまたは銅イオン供給物質(例、銅、硫酸銅、酢酸銅、臭化銅、ふっ化銅、蔞酸銅、塩化銅、ぎ酸銅、酢酸銅、硝酸銅等)、カルシウムイオン供給物質
25 (例、カルシウム、硫酸カルシウム、酢酸カルシウム、硝酸カルシウム、ぎ酸カルシウム、塩化カルシウム等)若しくはマグネシウムイオン供給物質(例、

- マグネシウム、硫酸マグネシウム、酢酸マグネシウム、硝酸マグネシウム、ギ酸マグネシウム、塩化マグネシウム等)とポリペプチドを接触させる方法としては、例えば、銅イオン、カルシウムイオン若しくはマグネシウムイオンまたは銅イオン供給物質、カルシウムイオン供給物質若しくはマグネシウムイオン供給物質を抽出液またはリフォールディング緩衝液に添加すること、または抽出液およびリフォールディング緩衝液のそれぞれに添加することによって行うことが出来る。用いる抽出液のpHは4~10好ましくは6~9さらに好ましくは7~9である。リフォールディング液のpHは3~10好ましくは3~8さらに好ましくは4~6である。銅イオン、カルシウムイオン若しくはマグネシウムイオンまたは銅イオン供給物質、カルシウムイオン供給物質若しくはマグネシウムイオン供給物質としては、例えば硫酸銅、塩化カルシウムまたは硫酸マグネシウムの場合では、0.1~10000 μ M好ましくは1~1000 μ Mさらに好ましくは1~100 μ Mの濃度で抽出液またはリフォールディング緩衝液添加する、もしくは抽出液およびリフォールディング緩衝液の両者に添加する。抽出を行う条件は、0~37℃で1~96時間、リフォールディングの条件としては、0~37℃で1~96時間があげられる。

- またリフォールディングの前あるいは後に本発明のポリペプチドと銅イオン、カルシウムイオン若しくはマグネシウムイオンまたは銅イオン供給物質、カルシウムイオン供給物質若しくはマグネシウムイオン供給物質とを接触させてもよい。精製後に、銅イオン、カルシウムイオン若しくはマグネシウムイオンまたは銅イオン供給物質(銅、硫酸銅、酢酸銅、臭化銅、ふっ化銅、蔞酸銅、塩化銅、ギ酸銅、酢酸銅、硝酸銅等)、カルシウムイオン供給物質(例、カルシウム、硫酸カルシウム、酢酸カルシウム、硝酸カルシウム、ギ酸カルシウム、塩化カルシウム等)若しくはマグネシウムイオン供給物質(例、マグネシウム、硫酸マグネシウム、酢酸マグネシウム、硝酸マグネシウム、ギ酸マグネシウム、塩化マグネシウム等)と本発明のポリペプチドとを接触させる方法とし

ては、例えば、精製後の本発明のポリペプチドを銅イオン、カルシウムイオン若しくはマグネシウムイオンまたは銅イオン供給物質、カルシウムイオン供給物質若しくはマグネシウムイオン供給物質を含有する溶液（例えば、ピリジン溶液、酢酸緩衝液、トリスヒドロキシメタン緩衝液、リン酸緩衝液など）中に

5 、蛋白（ポリペプチド）濃度として0.01～50 mg/mL、好ましくは0.1～20 mg/mL さらに好ましくは1～10 mg/mLで混合または溶解し、0～37℃で0.1～24時間活性化を行う。銅イオン、カルシウムイオン若しくはマグネシウムイオンまたは銅イオン供給物質、カルシウムイオン供給物質若しくはマグネシウムイオン供給物質としては、例えば硫酸銅の場合では、0.01～1000 mM 好ましくは0.1～

10 100 mM さらに好ましくは0.1～10 mM の濃度で添加する。

さらに、精製後の本発明のポリペプチドをEP0812856号に記載の方法に準じてN末端のメチオニンを除去する工程において、銅イオン、カルシウムイオン若しくはマグネシウムイオンまたは銅イオン供給物質（銅、硫酸銅、酢酸銅、臭化銅、ふっ化銅、蔞酸銅、塩化銅、ぎ酸銅、酢酸銅、硝酸銅等）、

15 カルシウムイオン供給物質（例、カルシウム、硫酸カルシウム、酢酸カルシウム、硝酸カルシウム、ぎ酸カルシウム、塩化カルシウム等）若しくはマグネシウムイオン供給物質（例、マグネシウム、硫酸マグネシウム、酢酸マグネシウム、硝酸マグネシウム、ぎ酸マグネシウム、塩化マグネシウム等）と接触させ、N末端のメチオニンが除去された活性化された本発明のポリペプチドを得る

20 こともできる。

上述の活性化方法により活性化された本発明のポリペプチドは骨髓幹細胞コロニー形成の阻止作用を有することから、たとえば癌化学療法剤から骨髓幹細胞を保護し、抗癌剤投与時の白血球の減少を回復させるための医薬などに用いることができる。

25 本発明のポリペプチドを上述の医薬として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣や腸溶性被膜を施した錠剤

- 、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤
- 5 、結合剤などとともに一般に認められた単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

- 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶
- 10 性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射の
- 15 ための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

- 注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと
- 20 併用してもよい。

また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化

剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

- 5 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや哺乳動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 本発明のポリペプチドの投与量は、症状などにより差異はあるが、たとえば注射剤の形では成人の癌患者（体重60kgとして）への投与においては、
10 日につき約0.01から30mg程度、好ましくは約0.1から20mg程度、より好ましくは約0.1から10mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

- 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、
15 IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

- | | | |
|----|------|---------------|
| | DNA | : デオキシリボ核酸 |
| 20 | cDNA | : 相補的デオキシリボ核酸 |
| | A | : アデニン |
| | T | : チミン |
| | G | : グアニン |
| | C | : シトシン |
| 25 | RNA | : リボ核酸 |
| | mRNA | : メッセンジャーリボ核酸 |

	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
5	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
	Gly	: グリシン
	Ala	: アラニン
10	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン
	Ser	: セリン
	Thr	: スレオニン
15	Cys	: システイン
	Met	: メチオニン
	Glu	: グルタミン酸
	Asp	: アスパラギン酸
	Lys	: リジン
20	Arg	: アルギニン
	His	: ヒスチジン
	Phe	: フェニルアラニン
	Tyr	: チロシン
	Trp	: トリプトファン
25	Pro	: プロリン
	Asn	: アスパラギン

Gln : グルタミン

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

本発明のMPIF-1Δ23のアミノ酸配列を示す。

5 〔配列番号：2〕

参考例1で用いられたプライマー1の塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕

参考例1で用いられたプライマー2の塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕

10 参考例1で用いられたプライマー3の塩基配列を示す。

後述の参考例1で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) MM294 (DE3) / pTCIId23-MPIF1は、1998年1月24日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託番号FERM BP-6582として、1998年10月27日から財団法人・発酵研究所 (IFO) に寄託番号IFO 16212として寄託されている。

実施例

以下に参考例および実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

参考例1 MPIF-1Δ23発現株の構築

25 成熟体MPIF-1の構造遺伝子を、ヒト肝臓cDNAライブラリー (Quick-Clone, CLONTECH社製) より、構造遺伝子の5'上流に隣接してNde I切断部位及び開始コード

ンを持つプライマー 1 (5'-CATATGCGGG TCACAAAAGA TGCAGAGACA GAG ; 配列番号 : 2) 、及び終始コドン下流に隣接してBam HI切断部位を持つプライマ 2 (5'-CATATGGGACAGATTCCATGCTACTAGTGCTGA ; 配列番号 : 3) を用いて、PCRで増幅した。PCRにより増幅した遺伝子を、TA original cloning kit (インヴィトロジェン社製) を用いてpCR2.1ベクターに連結し、pCR2.1/MPIF-1を作製した。これを大腸菌JM109に導入し、アンピシリン耐性と β -ガラクトシダーゼ活性を指標として形質転換体を選択した。pCR2.1/MPIF-1を有する形質転換体を培養し、QIAprep8 Miniprep kit (キアゲン社製) を用いてpCR2.1/MPIF-1を調製した。

成熟体MPIF-1のN末端23個のアミノ酸を欠失させたMPIF-1 Δ 23の構造遺伝子はpCR2.1/MPIF-1よりPCRによって取得した。成熟体MPIF-1の24番目のAspをコードする遺伝子の下流に隣接してNde I切断部位及び開始コドンを持つプライマー 3 (5'-CATATGCGGG TCACAAAAGA TGCAGAGACA GAG ; 配列番号 : 4) 及びプライマー 2を用いてPCRによりMPIF-1 Δ 23の構造遺伝子を増幅した。PCRにより増幅した遺伝子を、TA original cloning kit (インヴィトロジェン社製) を用いてpCR2.1ベクターに連結し、pCR2.1/ d23-MPIF1を作製した。これを大腸菌JM109に導入し、アンピシリン耐性と β -ガラクトシダーゼ活性を指標として形質転換体を選択した。pCR2.1/ d23-MPIF1を有する形質転換体を培養し、QIAprep8 Miniprep kit (キアゲン社製) を用いてpCR2.1/ d23-MPIF1を調製した。

MPIF-1 Δ 23の発現プラスミドは以下のように構築した。pBR322をNde Iで切断、T4 DNAポリメラーゼ (DNA Blunting kit, 宝酒造株式会社製) で末端を平滑化し、再度連結する事によって、Nde I認識部位を欠損させたpBRdesNdeを作製した。pET3cをBgl II - Eco RVで切断し、約0.26kbpの断片を回収した後、T4 DNAポリメラーゼで末端を平滑化し、pBRdesNdeのSca I断片と連結して、pBR/T7 desNdeを作製した。また、部位特異的変異導入 (Quick Change, STRATAGENE社製) により、pBR322のBam HI認識部位を欠損させたpBR322desBamを作製した。pBR322desBamのSph I - Eco RV断片をpBR/T7 desNdeのSph I - Eco RV断片と連

結して、テトラサイクリン耐性発現ベクターpTCIIを作製した。pCR2.1/ d23-MPIF1をNde I及びBam HIで切断してアガロース電気泳動を行い、約240 bpのMPIF-1Δ23構造遺伝子をQIAquick Spin Purification Kit (キアゲン社製)を用いて回収した。発現ベクターpTCIIをNde I及びBam HIで切断してアガロース電気泳動を行い、同様に約4.6 kbpのバンドを回収した。MPIF-1Δ23構造遺伝子を発現ベクターpTCIIのNde I-Bam HI断片と連結した後、大腸菌JM109に導入してテトラサイクリン耐性で形質転換株を選択し、その株より再度プラスミドを回収して、発現プラスミドpTCII/ d23-MPIF1とした。

このpTCII/ d23-MPIF1を大腸菌MM294 (DE3)に導入して、テトラサイクリン耐性で形質転換株を選択し、MPIF-1Δ23発現株MM294 (DE3)/ pTCII d23-MPIF1を取得した。

参考例2 MPIF-1Δ23発現株の培養

参考例1で得られたMPIF-1Δ23発現株MM294 (DE3)/ pTCII d23-MPIF1を10mg/Lのテトラサイクリンを含むLB培地(1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム)1リットルで30℃16時間培養した。得られた培養液を20リットルの主発酵用培地(1.68%リン酸一水素ナトリウム、0.3%リン酸二水素ナトリウム、0.1%塩化アンモニウム、0.05%塩化ナトリウム、0.024%硫酸マグネシウム、0.02%ニューポールLB-625、0.0005%塩酸チアミン、1.5%ブドウ糖、1.0%カザミノ酸、1.0%イーストエキス)を仕込んだ50L容発酵槽に移植して、37℃、通気量16 L/min、攪拌回転数200 rpmで通気攪拌培養を開始した。培養液の濁度が約1300クレット単位になった時点で、5.95 mg/L分のイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加した。IPTG添加後24分、130分及び200分後に0.75%のグルコースを添加し培養開始9.5時間後まで培養を行った。培養液を12000 rpmで約300 mL/minで連続遠心分離を行い、菌体620 gを得た。

参考例3 MPIF-1Δ23の精製

参考例2で得られた菌体 65 g に65 mLの25 mM EDTA を含む0.1 M Tris-HCl (pH7.5)を加えて懸濁し、ソニファイアー (プランソン社製)を用いて連続超音波破碎を行い菌体を破碎した。菌体破碎液を、遠心分離 (10000 rpm、20分間) を
5 行い、上清を廃棄し、封入体を得た。この封入体に25 mM EDTA 及び 3M グアニジン塩酸塩を含む0.1M Tris-HCl (pH7.5)を130 mL加え、封入体を溶解し、遠心分離 (10000 rpm、20分間) を行った。得られた上清液 130 mLに2 mM EDTA 及び0.125 M 塩化ナトリウムを含む0.1M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) 1.3 Lを加え、4℃で一晩リフォールディングを行った後、遠心分離 (10000 rpm、20分
10 間) を行い、遠心上清液 60 Lを得た。この遠心上清液を50 mMリン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したヘパリントヨパールカラム (2.6 cm x 26 cm、東ソー社) に毎分20 mLの流速で吸着させ、平衡化に用いた緩衝液でよく洗浄した後、毎分8 mLの流速で1 Mの塩化ナトリウム直線濃度勾配により溶出を行った。MPIF-1Δ23を含む画分を集め、分画分子量1000の透析膜を用いて50 mM酢酸ナトリウム
15 緩衝液 (pH 5.8) に対して4℃で一晩透析を行い、50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) で平衡化したTSKgel SP-5PWカラム (2.15 cm x 15 cm、東ソー社) に添加した。MPIF-1Δ23が吸着したTSKgel SP-5PWカラムを、1.5 Mの塩化ナトリウム直線濃度勾配により溶出を行った。MPIF-1Δ23を含む画分を集め、セントリプレップ3 (分画分子量3000、アミコン社) を用いて限外濾過濃縮を行
20 った。

濃縮液を150 mM 塩化ナトリウムを含む50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) で平衡化した Sephacryl S100HRカラム (4.4 cm x 47.3 cm、アマシャムファルマシアバイオテク社) によりゲル濾過を行い、MPIF-1Δ23精製品149 mgを得た。この MPIF-1Δ23のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動の結果を図1に示す。
25 MPIF-1Δ23精製品を4%チオグリコール酸を含む6N塩酸で110℃、24及び48時間気相加水分解を行い、アミノ酸分析計 (日立L-8500AAmino Acid Analyzer

を用いてアミノ酸組成を決定した。その結果、表1に示されるようにcDNA塩基配列から予想されるアミノ酸組成と一致した。

表1

参考例3で調製したMPIF-1 Δ 23のアミノ酸組成

amino acid	MPIF-1 Δ 23 理論値	測定値
Asx	7	6.8
Thr	6	6.0
Ser	8	7.4
Glx	5	5.0
Pro	4	3.8
Gly	2	2.0
Ala	3	3.0
Val	3	2.8
Met	3	2.9
Ile	4	3.7
Leu	5	5.1
Tyr	2	2.0
Phe	4	3.8
Lys	7	6.7
His	1	1.0
Arg	7	6.9

Ser、Thrは0hrに外挿
他は24、48hr 平均値

さらに、N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー（アプライドバイオシステムズ モデル477A）を用いて決定した。その結果、表2に示されるようにcDNA塩基配列から予想されるアミノ酸配列と一致した。

表2

参考例3で調製したMPIF-1Δ23のN末端アミノ酸配列

残基No.	検出されたPTH* アミノ酸 (pmol)	MPIF-1Δ23 の配列
1	Met(426)	Met
2	Asp(379)	Asp
3	Arg(209)	Arg
4	Phe(340)	Phe
5	His(121)	His
6	Ala(284)	Ala
7	Thr(117)	Thr
8	Ser(78)	Ser
9	Ala(144)	Ala
10	Asp(84)	Asp

PTH*: フェニールチオヒダントイン
1nmolを用いて分析を行った。

実施例1 MPIF-1Δ23 不活性体の硫酸銅処理による活性化

参考例3で取得した MPIF-1Δ23を0.1、0.5、1、5及び10 mM硫酸銅を含む1.0M
ピリジン緩衝液（pH 5.9）に0.5 mg/mLになるように加え、室温で1時間処理
を行った後、150 mM 塩化ナトリウムを含む50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.8

5)で平衡化した NAP-5カラム (アマシャムファルマシアバイオテク社) により緩衝液の置換を行った。活性化前及び後のMPIF-1 Δ 23のマウス骨髄細胞分化抑制作用の測定を以下に記載した方法により行った。5~12週令のC57BL/6マウス (♀) をドライアイスで窒息死させた後、大腿骨を取り出し、25Gの注射針を用いて10%FBS-IMDMをフラッシュすることにより骨髄より骨髄細胞を取り出した。予め4 mLのヒストバック1119を加えた15 mL容の遠心チューブに骨髄細胞懸濁液を静かに重層し、遠心分離 (750 g、30分間) を行い細胞を集めた。中間層の細胞を集め、10%FBS-IMDMで2回洗浄した後、10 mLの10%FBS-IMDMに懸濁した後、10cm Φ の細胞培養用シャーレに播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 下で2時間静置した。骨髄細胞以外の細胞を接着させたシャーレを軽く揺すった後、培養液を遠心管に移し、遠心分離 (1000 rpm、5分間) を行い細胞を集めた。細胞を44,000 cells/mLになるように10%FBS-IMDMに懸濁し、マウスIL-1 α (ジェンザイム社製) 2.5 ng/mL、マウスIL-3 (アップステートバイオテクノロジー社製) 2.5 ng/mL、マウスSCF (ジェンザイム社製) 10 ng/mL、ヒトM-CSF (ジェンザイム社製) 10 ng/mL及び MPIF-1 Δ 23を含む完全メチルセルロース培地メトカルト (ペリタス社製) 中で37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 、7% O $_2$ 下で7日間培養した。培養後の各ウェルを顕微鏡下で観察し、コロニーの直径が0.5 mm未満のものをLPP-CFCとして、ウェル中のLPPの数を測定した。MPIF-1 Δ 23無添加時のLPP-CFCコロニー数を100%としてMPIF-1 Δ 23添加時のコロニー形成抑制の割合を%で示した。測定結果を図2に示した。

10

15

20

25

。参考例3において取得したMPIF-1 Δ 23を添加した場合のLPP-CFCコロニー形成抑制は0.1 ng/mLで-1%、1.0 ng/mLで22%で、コロニー形成抑制作用がほとんど認められないのに対して、1 mMの硫酸銅で処理を行った場合に最も高い活性が認められ、0.1 ng/mLで44%、1 ng/mLで52% とLPP-CFCコロニーの形成を抑制した。

実施例2 MPIF-1 Δ 23 不活性体のN末端アミノ酸除去処理による活性化

参考例3で取得した MPIF-1Δ23 25 mg を0.15Mグリオキシル酸及び5 mM硫酸銅を含む1.0Mピリジン緩衝液 (pH 5.9) 25 mLに加え、室温で1時間処理を行った後、150 mM 塩化ナトリウムを含む50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) で平衡化した Sephadex G-25カラム (3.2 x 45 cm、アマシャムファルマシア

5 バイオテク社) により緩衝液の置換を行った。Sephadex G-25の溶出液 60 mL に酢酸ナトリウム、ギ酸及びフェニレン-1, 2-ジアミンをそれぞれ2 M、2 M 及び40mMになるように加え、37℃で15時間反応を行った。反応終了後、YM-3限外濾過膜 (アミコン社) で約50mLまで濃縮し、150 mM 塩化ナトリウムを含む50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) で平衡化した Sephadex G-25カラム (3.2

10 x 45 cm、アマシャムファルマシアバイオテク社) により緩衝液の置換を行った。Sephadex G-25の溶出液 60 mLを150 mM 塩化ナトリウムを含む50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) で平衡化したTSK gel CM-5PWカラム (2.15 x 15 cm、東ソー社) に吸着させ、1.5Mの塩化ナトリウム直線濃度勾配により溶出を行った。MPIF-1Δ23を含む画分を集め、セントリプレップ3 (分画分子量3000、アミコン社) を用いて、液量が約 3 mLになるまで、限外濾過濃縮を行

15 った。濃縮液を150 mM 塩化ナトリウムを含む50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.8) で平衡化した Hi-Load 16/60 Superdex 75カラム (2.6 cm x 60 cm、アマシャムファルマシアバイオテク社) によりゲル濾過を行い、N末端メチオニンを除去したMPIF-1Δ23 (Des-Met MPIF-1Δ23) 精製品 8.5 mgを得た。Des-Met MPIF-1

20 Δ23精製品を4%チオグリコール酸を含む6N塩酸で110℃、24及び48時間気相加水分解を行い、アミノ酸分析計 (日立L-8500 AAmino Acid Analyzer) を用いてアミノ酸組成を決定した。その結果、表3に示されるとおり、cDNA 塩基配列から予想されるアミノ酸組成と一致した。

表3

実施例2で調製したDes-Mel MPIF-1 Δ 23のアミノ酸組成

amino acid	MPIF-1 Δ 23 理論値	測定値
Asx	7	7.2
Thr	6	5.4
Ser	8	8.3
Glx	5	5.0
Pro	4	3.6
Gly	2	2.1
Ala	3	2.9
Val	3	3.0
Met	3	2.0
Ile	4	3.7
Leu	5	5.2
Tyr	2	2.0
Phe	4	3.9
Lys	7	6.9
His	1	1.1
Arg	7	6.8

Ser、Thrは0hrに外挿
他は24, 48hr平均値

さらに、N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー（アプライドバイオシステムズ モデル477A）を用いて決定した。その結果、表4に示されるとおり、cDNA塩基配列から予想されるアミノ酸配列と一致した。

表4

実施例2で調製したDes-Met MPIF-1 Δ23のN末端アミノ酸配列

残基No.	検出されたPTH* アミノ酸 (pmol)	MPIF-1 Δ23 の配列
1	Asp(272)	Met
2	Arg(238)	Asp
3	Phe(390)	Arg
4	His(81)	Phe
5	Ala(193)	His
6	Thr(71)	Ala
7	Ser(49)	Thr
8	Ala(55)	Ser
9	Asp(51)	Ala
10	-	Asp

PTH*: フェニルチオヒダントイン
1nmolを用いて分析を行った。

15

両分析により、N末端のメチオニンが除去されているのを確認した。このマウス骨髄細胞分化抑制作用の測定を測定した結果を、図3に示した。上記方法により調製したDes-Met MPIF-1 Δ23は参考例3で取得した活性化処理前のMPIF-1 Δ23より高い活性を示した。

また、以下の方法によりカルシウムイオンの細胞内動員活性についても測定を行った。THP-1細胞(ATCC、TIB-202)を 5×10^6 細胞/mLになるように1mM塩化カルシウムを含むMG緩衝液(Modified Gey's Buffer)に懸濁し、蛍光指示薬 Fura PE3/AM(和光純薬社)を $2 \mu\text{M}$ になるように加え、 37°C で30分間保持した。細胞をMB緩衝液で洗浄した後、1mM塩化カルシウムを含むMG緩衝液で 2.5×10^6 細胞/mLになるように懸濁し、96穴プレートに $100 \mu\text{L}$ ずつ分注し、

参考例 3 において取得したMPIF-1 Δ 23及び上記で取得したDes-Met MPIF-1 Δ 23を添加し、フルオレッセンスドラッグスクリーニングシステム（浜松ホトニクス社）を用いて細胞内カルシウム濃度の変化量を測定した。この結果を図 4 に示す。上記方法により取得したDes-Met MPIF-1 Δ 23では参考例 3 で取得した活性化処理前のMPIF-1 Δ 23に比べ高い活性が認められた。

実施例 3

参考例 3 で取得した MPIF-1 Δ 23を1 mM硫酸銅または塩化カルシウムまたは硫酸マグネシウムを含む50mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.8）に0.5 mg/mLになるように加え、室温で1時間処理を行った後、150 mM 塩化ナトリウムを含む50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.8）で平衡化した NAP-5カラム（アマシャムファルマシアバイオテク社）により緩衝液の置換を行った。活性化前及び後のMPIF-1 Δ 23のマウス骨髄細胞分化抑制作用の測定を実施例 1 に記載した方法により行った。参考例 3 で取得した活性化前のMPIF-1 Δ 23に比べて何れも高い活性が見られた（図 5）。

産業上の利用可能性

本発明の活性化方法または製造法は、癌化学療法剤から骨髄幹細胞を保護し、抗ガン剤投与時のリミティングファクターである白血球の減少を速やかに回復させる効果を有する活性型MPIF-1 Δ 23を、大量かつ安価に製造することを可能にする。

請求の範囲

1. 精製された配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドと銅イオン、カルシウムイオン若しくはマグネシウムイオンまたは銅イオン供給物質、カルシウムイオン供給物質
5 若しくはマグネシウムイオン供給物質とを接触させることを特徴とする該ポリペプチドの活性化方法。
2. 銅イオン供給物質が銅、硫酸銅、臭化銅、ふっ化銅、蔞酸銅、塩化銅、ぎ酸銅、酢酸銅または硫化銅である請求項1記載の方法。
3. 銅イオン供給物質が硫酸銅である請求項2記載の方法。
- 10 4. カルシウムイオン供給物質が、カルシウム、硫酸カルシウム、酢酸カルシウム、硝酸カルシウム、ぎ酸カルシウムまたは塩化カルシウムである請求項1記載の方法。
5. カルシウムイオン供給物質が塩化カルシウムである請求項4記載の方法。
6. マグネシウムイオン供給物質が、マグネシウム、硫酸マグネシウム、酢酸
15 マグネシウム、硝酸マグネシウム、ぎ酸マグネシウムまたは塩化マグネシウムである請求項1記載の方法。
7. マグネシウムイオン供給物質が硫酸マグネシウムである請求項6記載の方法。
8. 活性化されたポリペプチドの有する活性が細胞分化抑制活性である請求項
20 1記載の方法。
9. 精製された配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドと銅イオン、カルシウムイオン若しくはマグネシウムイオンまたは銅イオン供給物質、カルシウムイオン供給物質
25 若しくはマグネシウムイオン供給物質とを接触させることを特徴とする活性型ポリペプチドの製造方法。
10. 請求項1の活性化方法によって活性化されたポリペプチドもしくはその

アミドもしくはそのエステルまたはその塩。

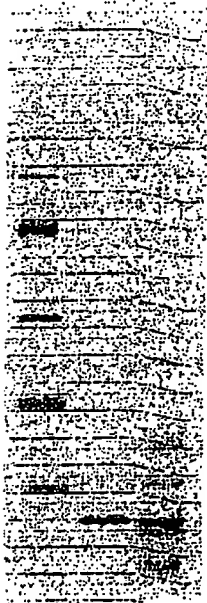


1

M1

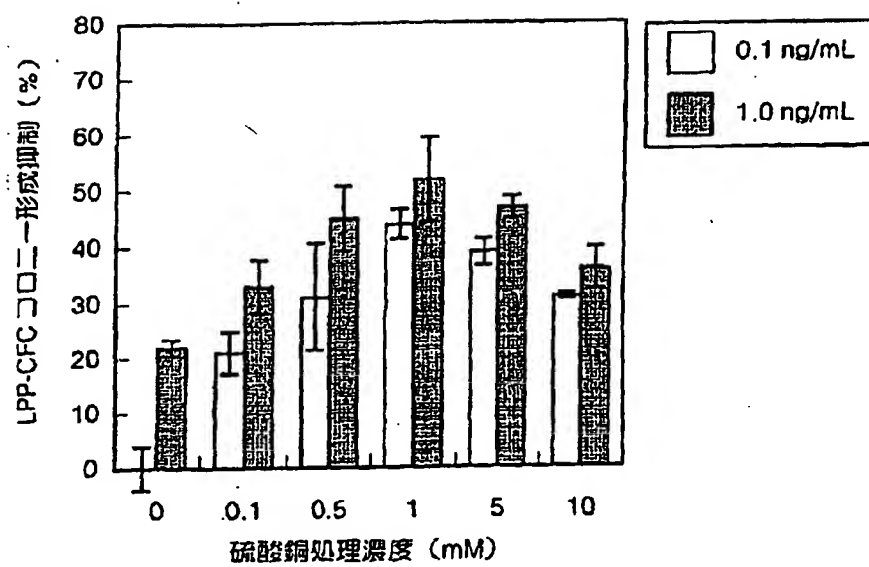
MPIF-1 Δ 23

M2



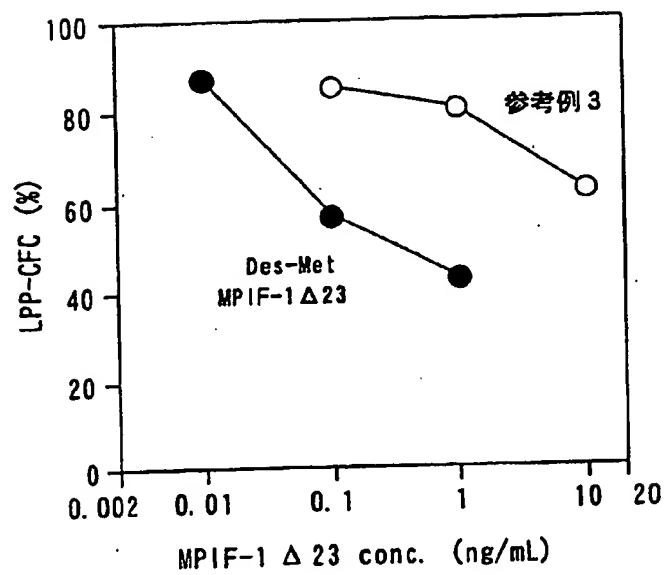


2





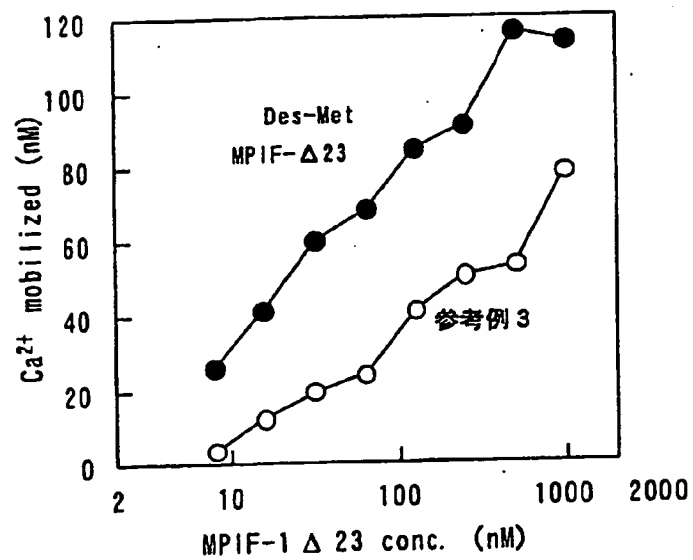
3



Met除去反応による活性化
(マウス骨髄細胞分化抑制活性)

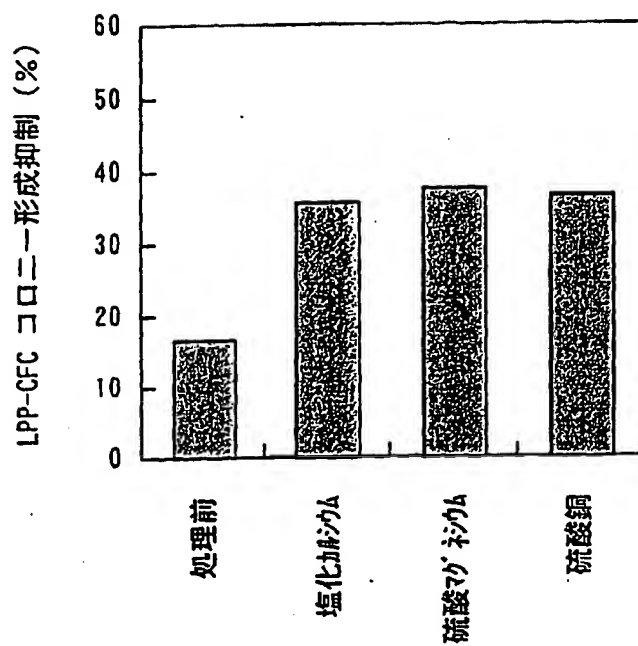


4



Met除去反応による活性化
(THP-1細胞Ca²⁺動員活性)

図 5



塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、硫酸銅による活性化

SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Method for Production of an Activated Protein

<130> 2587W00P

<150> JP 11-001840

<151> 1999-01-07

<150> JP 11-004426

<151> 1999-01-11

<160> 4

<210> 1

<211> 77

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Asp Arg Phe His Ala Thr Ser Ala Asp Cys Cys Ile Ser Tyr Thr

1 5 10 15

Pro Arg Ser Ile Pro Cys Ser Leu Leu Glu Ser Tyr Phe Glu Thr Asn

20 25 30

Ser Glu Cys Ser Lys Pro Gly Val Ile Phe Leu Thr Lys Lys Gly Arg

35 40 45

Arg Phe Cys Ala Asn Pro Ser Asp Lys Gln Val Gln Val Cys Met Arg

50 55 60

Met Leu Lys Leu Asp Thr Arg Ile Lys Thr Arg Lys Asn

65 70 75

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 2

CATATGCGGG TCACAAAAGA TGCAGAGACA GAG

33

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 3

CATATGGGAC AGATTCCATG CTACTAGTGC TGA

33

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 4

CATATGCGGG TCACAAAAGA TGCAGAGACA GAG

33

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPOO/00024

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C07K14/47, C12P21/02, C12N15/12
// (C12P21/02, C12R1:19)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C07K14/47, C12P21/02, C12N15/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
SwissProt/PIR/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	WO, 98/14582, A (GENOME SCIENCES, INC.) 9. 4月. 1998 (09. 04. 98) & EP, 941330, A1	10 /1-9
Y	JP, 9-262093, A (武田薬品工業株式会社) 7. 10月. 1997 (07. 10. 97) ファミリーなし	1-10
Y	EP, 586872, A1 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 16. 3月. 1994 (16. 03. 94) & US, 5434067, A & JP, 6-153938, A	1-10
PY	JP, 11-266865, A (積水化学工業株式会社) 5. 10月. 1999 (05. 10. 99) ファミリーなし	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 03. 00

国際調査報告の発送日

11.04.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

印

4N

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 92/09623, A1 (ROUSSEL-UCLAF) 11. 6月. 1992 (11. 06. 92) & EP, 511964, A1 & US, 5252708, A & JP, 5-503004, A	1-10
A	JP, 7-147992, A (株式会社神戸製鋼所) 13. 6月. 1995 (13. 06. 95) ファミリーなし	1-10

15T

特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
(PCT36条及びPCT規則70)



出願人又は代理人 の書類記号 2587WOOP	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/00024	国際出願日 (日.月.年) 06.01.00	優先日 (日.月.年) 07.01.99
国際特許分類(IPC) Int. Cl ⁷ C07K14/47, C12P21/02, C12N15/12 // (C12P21/02, C12R1:19)		
出願人(氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 28.04.00	国際予備審査報告を作成した日 15.12.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 本間 夏子	4N 9637
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)

1. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☒ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-9	有
	請求の範囲	10	無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-10	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-10	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

特許請求の範囲の請求項10は、国際調査報告で引用された文献1 (WO, 98/1458 2, A) より新規性を有しない。特許請求の範囲請求項の請求項10について、上記文献1には、MP1F-1について記載されており、物質として差異がない。

特許請求の範囲の請求項1～9は、国際調査報告で引用された上記文献1、文献2 (JP, 9-262093, A)、文献3 (EP, 586872, A1)により進歩性を有しない。

特許請求の範囲の請求項1～10について、上記文献2及び3には、遺伝子工学的に製造させた蛋白質（酵素）を活性化させるために銅、亜鉛、マグネシウム等の金属塩を接触させる旨記載されている。上記文献1に記載のMP1F-1蛋白質を遺伝子工学的に製造し該蛋白質の活性化物を得るために、上記文献2～3に記載の遺伝子工学的に製造した蛋白質を活性化させる技術を適用することは、当業者が容易に想到することであると認められる。

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

13 July 2000 (13.07.00)

International application No.:

PCT/JP00/00024

Applicant's or agent's file reference:

2587WO0P

International filing date:

06 January 2000 (06.01.00)

Priority date:

07 January 1999 (07.01.99)

Applicant:

ITO, Takashi et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

28 April 2000 (28.04.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

許 協 力 条 約

担当者	G・M	Pat・M	部長

2

発信人 日本国特許庁（受理官庁）

出願人代理人

高橋 秀一

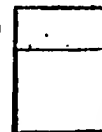
殿

あて名

〒532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85
武田薬品工業株式会社知的財産部

P C T



国際出願番号及び
国際出願日の通知書

234回
(2001.3月分)

（法施行規則第22条、第23条）
〔PCT規則20.5(c)〕

PCT/JP00/00024

RO105

発送日（日．月．年）

18.01.00

出願人又は代理人

の書類記号

2587WOOP

重 要 な 通 知

国際出願番号

PCT/JP00/00024

国際出願日（日．月．年）

06.01.00

優先日（日．月．年）

07.01.99

出願人（氏名又は名称）

武田薬品工業株式会社

1. この国際出願は、上記の国際出願番号及び国際出願日が付与されたことを通知する。

記録原本は、18日01月00年に国際事務局に送付した。

注 意

- 国際出願番号は、特許協力条約を表示する「PCT」の文字、斜線、受理官庁を表示する2文字コード（日本の場合JP）、西暦年の最後から2桁の数字、斜線、及び5桁の数字からなっています。
- 国際出願日は、「特許協力条約に基づく国際出願に関する法律」第4条第1項の要件を満たした国際出願に付与されます。
- あて名等を変更したときは、速やかにあて名の変更届等を提出して下さい。
- 電子計算機による漢字処理のため、漢字の一部を当用漢字、又は、仮名に置き換えて表現してある場合もありますので御了承下さい。
- この通知に記載された出願人のあて名、氏名（名称）に誤りがあるときは申出により訂正します。
- 国際事務局は、受理官庁から記録原本を受領した場合には、出願人にその旨を速やかに通知（様式PCT/IB/301）する。記録原本を優先日から14箇月が満了しても受領していないときは、国際事務局は出願人にその旨を通知する。〔PCT規則22.1(c)〕

名称及びあて名

日本国特許庁（RO/JP）

郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308

日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

様式PCT/RO/105（1998年7月）

権限のある職員

特 許 庁 長 官

担当者	G・M		Pat・M	部

特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒 532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85
武田薬品工業株式会社知的財産部

PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

（法施行規則第57条）
（PCT規則71.1）

発送日

（日.月.年）

26.12.00

出願人又は代理人
の書類記号

2587WOOP

重要な通知

国際出願番号

PCT/JPO0/00024

国際出願日

（日.月.年） 06.01.00

優先日

（日.月.年） 07.01.99

出願人（氏名又は名称）

武田薬品工業株式会社

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。

3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。

4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第II巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4N

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

様式PCT/IPEA/416（1992年7月）

（添付用紙の注意書きを参照）

注 意

1. 文献の写しの請求について

国際予備審査報告に記載された文献であって国際調査報告に記載されていない文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することができますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

(1) 特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際予備審査報告の写しを添付してください（返却します）。

〔申込み及び照会先〕

〒100 東京都千代田区霞が関3-4-2 商工会館・弁理士会館ビル

財団法人 日本特許情報機構 サービス課

TEL 03-3503-3900

注) 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

2. 各選択官庁に対し、国際出願の写し（既に国際事務局から送達されている場合は除く）及びその所定の翻訳文を提出し、国内手数料を支払うことが必要となります。その期限については各国ごとに異なりますので注意してください。（条約第22条、第39条及び第64条(2)(a)(i)参照）

特許協力条約に基づく国際出願

願 書

出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

国際出願番号	受領印
国際出願日	06.1.00
(受付印)	

出願人又は代理人の書類記号
(希望する場合、最大12字)

2587WO0P

第 I 欄 発明の名称

活性化蛋白質の製造法

097653201

第 II 欄 出願人

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

武田薬品工業株式会社
TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
〒541-0045 日本国大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku, Osaka-shi,
OSAKA 541-0045 JAPAN

☐ この欄に記載した者は、
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電信番号:

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☒ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

第 III 欄 その他の出願人又は発明者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

伊藤 隆司 ITO Takashi
〒658-0032 日本国兵庫県神戸市東灘区向洋町中1丁目10番地10
1-2003号
10-101-2003, Koyochonaka 1-chome, Higashinada-ku, Kobe-shi,
)HYOGO 658-0032 JAPAN

この欄に記載した者は、
次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、
以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続報に記載されている。

第 IV 欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒ 代理人

☐ 共通の代表者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

11404 弁理士 高橋秀一 TAKAHASHI Shuichi
〒532-0024 日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
武田薬品工業株式会社大阪工場内
c/o Osaka Plant of TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi,
OSAKA 532-0024 JAPAN

電話番号:

03-3278-2235

ファクシミリ番号:

03-3278-2222

加入電信番号:

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す

第Ⅲ欄の続き その他の出願人又は発明者

この続葉を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

田中 葉子 TANAKA Yoko
〒610-0331 日本国京都府京田辺市田辺勇田80-50
80-50, Tanabeyuden, Kyotanabe-shi, KYOTO 610-0331 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

- ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

改正 知子 KAISHO Tomoko
〒532-0013 日本国大阪府大阪市淀川区木川西4丁目4番16-507
4-16-507, Kikawanishi 4-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi, OSAKA
532-0013 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

- ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

西村 紀 NISHIMURA Osamu
〒305-0812 日本国茨城県つくば市大字東平塚586番地2
586-2, Oaza Higashihiratsuka, Tsukuba-shi, IBARAKI 305-0812
JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☒ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 Japan

住所 (国名): 日本国 Japan

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

- ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載;法人は公式の完全な名称を記載;あて名は郵便番号及び国名も記載)

この欄に記載した者は、次に該当する:

- ☐ 出願人のみである。
☐ 出願人及び発明者である。
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍 (国名):

住所 (国名):

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である:

- ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☐ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☐ その他の出願人又は発明者が他の続葉に記載されている。

第Ⅴ欄 国の指定

規則 4. 9(a)の規定に基づき次の指定を行う（該当する□にレ印を付すこと；少なくとも1つの□にレ印を付すこと）。

広域特許

- ☒ AP ARIPO特許：GH ガーナ Ghana, GM ガンビア Gambia, KE ケニア Kenya, LS レソト Lesotho, MW マラウイ Malawi, SD スーダン Sudan, SZ スワジランド Swaziland, UG ウガンダ Uganda, ZW ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締結国である他の国
- ☒ EA ユーラシア特許：AM アルメニア Armenia, AZ アゼルバイジャン Azerbaijan, BY ベラルーシ Belarus, KG キルギス Kyrgyzstan, KZ カザフスタン Kazakhstan, MD モルドヴァ Republic of Moldova, RU ロシア Russian Federation, TJ タジキスタン Tajikistan, TM トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☒ EP ヨーロッパ特許：AT オーストリア Austria, BE ベルギー Belgium, CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, CY キプロス Cyprus, DE ドイツ Germany, DK デンマーク Denmark, ES スペイン Spain, FI フィンランド Finland, FR フランス France, GB 英国 United Kingdom, GR ギリシャ Greece, IE アイルランド Ireland, IT イタリア Italy, LU ルクセンブルグ Luxembourg, MC モナコ Monaco, NL オランダ Netherlands, PT ポルトガル Portugal, SE スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締結国である他の国
- ☒ OA OAPI特許：BF ブルキナ・ファソ Burkina Faso, BJ ベナン Benin, CF 中央アフリカ Central African Republic, CG コンゴ Congo, CI コートジボアール Cote d'Ivoire, CM カメルーン Cameroon, GA ガボン Gabon, GN ギニア Guinea, GW ギニア・ビサウ Guinea-Bissau, ML マリ Mali, MR モーリタニア Mauritania, NE ニジェール Niger, SN セネガル Senegal, TD チャード Chad, TG トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国と特許協力条約の締結国である他の国（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する）

国内特許（他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する）

- | | |
|--|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE アラブ首長国連邦 United Arab Emirates | <input checked="" type="checkbox"/> MD モルドヴァ Republic of Moldova |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL アルバニア Albania | <input checked="" type="checkbox"/> MG マダガスカル Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM アルメニア Armenia | <input checked="" type="checkbox"/> MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT オーストリア Austria | <input checked="" type="checkbox"/> MN モンゴル Mongolia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU オーストラリア Australia | <input checked="" type="checkbox"/> MW マラウイ Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ アゼルバイジャン Azerbaijan | <input checked="" type="checkbox"/> MX メキシコ Mexico |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina | <input checked="" type="checkbox"/> NO ノールウェー Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB バルバドス Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> NZ ニュー・ジーランド New Zealand |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG ブルガリア Bulgaria | <input checked="" type="checkbox"/> PL ポーランド Poland |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR ブラジル Brazil | <input checked="" type="checkbox"/> PT ポルトガル Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY ベラルーシ Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> RO ルーマニア Romania |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA カナダ Canada | <input checked="" type="checkbox"/> RU ロシア Russian Federation |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> SD スーダン Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN 中国 China | <input checked="" type="checkbox"/> SE スウェーデン Sweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU キューバ Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> SG シンガポール Singapore |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ チェッコ Czech Republic | <input checked="" type="checkbox"/> SI スロヴェニア Slovenia |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE ドイツ Germany | <input checked="" type="checkbox"/> SK スロヴァキア Slovakia |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK デンマーク Denmark | <input checked="" type="checkbox"/> SL シエラ・レオネ Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE エストニア Estonia | <input checked="" type="checkbox"/> TJ タジキスタン Tajikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES スペイン Spain | <input checked="" type="checkbox"/> TM トルクメニスタン Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI フィンランド Finland | <input checked="" type="checkbox"/> TR トルコ Turkey |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB 英国 United Kingdom | <input checked="" type="checkbox"/> TT トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD グレナダ Grenada | <input checked="" type="checkbox"/> UA ウクライナ Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE グルジア Georgia | <input checked="" type="checkbox"/> UG ウガンダ Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH ガーナ Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> US 米国 United States of America |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM ガンビア Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> UZ ウズベキスタン Uzbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR クロアチア Croatia | <input checked="" type="checkbox"/> VN ヴイエトナム Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU ハンガリー Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> YU ユーゴスラヴィア Yugoslavia |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID インドネシア Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> ZA 南アフリカ共和国 South Africa |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL イスラエル Israel | <input checked="" type="checkbox"/> ZW ジンバブエ Zimbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN インド India | |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS アイスランド Iceland | |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP 日本 Japan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE ケニア Kenya | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG キルギス Kyrgyzstan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP 北朝鮮 Democratic People's Republic of Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR 韓国 Republic of Korea | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ カザフスタン Kazakhstan | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC セント・ルシア Saint Lucia | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK スリ・ランカ Sri Lanka | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LR リベリア Liberia | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LS レソト Lesotho | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LT リトアニア Lithuania | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LU ルクセンブルグ Luxembourg | |
| <input checked="" type="checkbox"/> LV ラトヴィア Latvia | |

以下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締結国となった国を指定（国内特許のために）するためのものである

- ☒ CR コスタリカ Costa Rica
☒ DM ドミニカ Dominica
☒ TZ タンザニア Tanzania
☒ MA モロッコ Morocco

確認の指定の宣言：出願人は、上記の指定に加えて、規則 4. 9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この宣言から除く旨の表示を追記欄にした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。（指定の確認は、指定を特定する通知の提出と指定手数料及び確認手数料の納付からなる。この確認は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。）

追記欄 この追記欄を使用しないときは、この欄を紙を願書に含めないこと。

1. 全ての情報を該当する欄の中に記載できないとき。

この場合は、「第何欄....の続き」(欄番号を表示する) と表示し、記載できない欄の指示と同じ方法で情報を記載する。；特に、

(i) 出願人又は発明者として3人以上いる場合で、「続表」を使用できないとき。

この場合は、「第Ⅲ欄の続き」と表示し、第Ⅲ欄で求められている同じ情報を、それぞれの者について記載する。

(ii) 第Ⅱ欄又は第Ⅲ欄の枠の中で、「追記欄に記載した指定国」にレ印を付しいるとき。

この場合は、「第Ⅱ欄の続き」、「第Ⅲ欄の続き」又は「第Ⅱ欄及び第Ⅲ欄の続き」と記載し、該当する出願人の氏名(名称)を表示し、それぞれの氏名(名称)の次にその者が出願人となる指定国(広域特許の場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許)を記載する。

(iii) 第Ⅱ欄又は第Ⅲ欄の枠の中で、発明者又は発明者及び出願人である者が、すべての指定国のための又は米国のための発明者ではないとき。

この場合は、「第Ⅱ欄の続き」、「第Ⅲ欄の続き」又は「第Ⅱ欄及び第Ⅲ欄の続き」と記載し、該当する発明者の氏名を表示し、その者が発明者である指定国(広域特許の場合は、ARIPO特許・ユーラシア特許・ヨーロッパ特許・OAPI特許)を記載する。

(iv) 第Ⅳ欄に示す代理人以外に代理人がいるとき。

この場合は、「第Ⅳ欄の続き」と表示し、第Ⅳ欄で求められている同じ情報を、それぞれの代理人について記載する。

(v) 第Ⅴ欄において指定国又はOAPI特許が、「追加特許」又は「追加証」を伴うとき、又は、米国が「継続」又は「一部継続」を伴うとき。

この場合は、「第Ⅴ欄の続き」及び該当するそれぞれの指定国又はOAPI特許を表示し、それぞれの指定国又はOAPI特許の後に、原特許又は原出願の番号及び特許付与日又は原出願日を記載する。

(vi) 第Ⅵ欄において優先権を主張する先の出願が4件以上あるとき。

この場合は、「第Ⅵ欄の続き」と表示し、第Ⅵ欄で求められている同じ情報を、それぞれの先の出願について記載する。

(vii) 第Ⅵ欄において先の出願がARIPOの特許出願であるとき。

この場合は、「第Ⅵ欄の続き」と表示し、その先の出願に対応する項目の番号を特定して、更に、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を表示する。

2. 出願人が、第Ⅴ欄における確認の指定の宣言に関し、その宣言からいずれかの国を除くことを希望するとき。

この場合は、「確認の指定の宣言から、以下の指定国を除く」と記載し、除かれる国名又は2文字の国コードを表示する。

3. 出願人が、指定官庁について不利にならない開示又は新規性の喪失についての例外に関する国内法の適用を請求するとき。

この場合は、「不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する陳述」と表示し、以下にその内容を記述する。

「第Ⅳ欄の続き」

11045 弁理士 内山 務 UCHIYAMA Tsutomu

〒532-0024 日本国大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
武田薬品工業株式会社大阪工場内

c/o Osaka Plant of TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.
17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka-shi,
OSAKA 532-0024 JAPAN

第VI欄 優先権主張

他の優先権の主張(先の出願)が追記欄に記載されて

先の出願日 (日. 月. 年)	先の出願番号	先 の 出 願		
		国内出願 : 国 名	広域出願 : *広域官庁名	国際出願 : 受理官庁名
(1) 07. 01. 99	平成11年特許願 第001840号	日本国 Japan		
(2) 11. 01. 99	平成11年特許願 第004426号	日本国 Japan		
(3)				

☒ 上記 () の番号の先の出願(ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限り)のうち、次の () の番号のものについては、出願書類の認証書を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁(日本国特許庁の長官)に対して請求している。 (1), (2)

*先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない(規則4.10(b)(ii))。追記欄を参照。

第VII欄 国際調査機関

国際調査機関 (ISA) の選択

ISA/JP

先の調査結果の利用請求; 当該調査の照会
(先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合)

出願日 (日. 月. 年)

出願番号

国名 (又は広域官庁)

第VIII欄 照合欄 ; 出願の言語

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

願書 5 枚
明細書 (配列表を除く) 27 枚
請求の範囲 2 枚
要約書 1 枚
図面 5 枚
明細書の配列表 2 枚
合計 42 枚

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

- ☒ 手数料計算用紙
- ☐ 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面
- ☐ 国際事務局の口座への振込みを証明する書面
- ☒ 別個の記名押印された委任状
- ☒ 包括委任状の写し
- ☐ 記名押印 (署名) の説明書
- ☐ 優先権書類 (上記第VI欄の () の番号を記載する):
- ☐ 国際出願の翻訳文 (翻訳に使用した言語名を記載する):
- ☐ 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面
- ☐ ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列表 (フレキシブルディスク)
- ☐ その他 (書類名を詳細に記載する)

要約書とともに提示する 図面:

本国際出願の使用言語名: 日本語

IX欄 提出者の記名押印

各人の氏名 (名称) を記載し、その次に押印する

高橋 秀一



内山 務



1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日 ———— 受理官庁記入欄

3. 国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であって
その後期間内に提出されたものの実際の受理の日 (訂正日)

4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日

5. 出願人により特定された
国際調査機関

ISA/JP

6. ☐ 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に
調査用写しを送付していない

2. 図面

☐ 受理された

☐ 不足図面がある

——— 国際事務局記入欄 ———

記録原本の受理の日

様式 PCT/RO/101 (最終用紙) (1998年7月:再版1999年7月)

P C T

手数料計算用紙
願 書 附 属 書

受理官庁記入欄

国際出願番号

出願人又は代理人の番類記号

2587WO0P

受理官庁の日付印

出願人

武田薬品工業株式会社

所定の手数料の計算

1. 及び2. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律（国内法）
第18条第1項第1号の規定による手数料（注1）
（送付手数料 [T] 及び調査手数料 [S] の合計）

95,000 円 T+S

3. 国際手数料（注2）

基本手数料

国際出願に含まれる用紙の枚数 42 枚

最初の30枚まで

46,000 円 b1

$\frac{12}{30 \text{ 枚を越える用紙の枚数}} \times \frac{1,100}{\text{用紙1枚の手数料}} =$

13,200 円 b2

b1及びb2に記入した金額を加算し、合計額をBに記入

59,200 円 B

指定手数料

国際出願に含まれる指定数（注3） 64

$\frac{8}{\text{支払うべき指定手数料の数（上限は8）（注4）}} \times \frac{9,900}{\text{1指定当たりの手数料（円）}} =$

79,200 円 D

B及びDに記入した金額を加算し、合計額をIに記入

138,400 円 I

4. 納付すべき手数料の合計

T+S及びIに記入した金額を加算し、合計額を台計に記入

233,400 円

合 計

（注1）送付手数料及び調査手数料については、合計金額を特許印紙をもって納付しなければならない。

（注2）国際手数料については、受理官庁である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振込を証明する書面を提出することにより納付しなければならない。

（注3）願書第V欄でレ印を付した ☐ の数。

（注4）指定数を記入する。ただし、10指定以上は一律10とする。

代理人選任証

29. 09. 1999

弁理士 高橋 秀一 殿

あて名 日本国大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
名称 武田薬品工業株式会社
代表者 武田 國男



すべての国際出願に関する手続について、貴殿を代理人に選任したことに
相違ありません。

包括委任状

12. 11. 97

私儀 弁理士 内山 務 を代理人と定めて、 特許協力条約に基づく
すべての国際出願に関する一切の件を委任します。

あて名 日本国大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

名 称 武田薬品工業株式会社

代表者 武 田 國 男



優先権証明願 (PCT)



特許庁長官殿

1. 事件の表示

平成11年特許願第1840号

2. 請求人

識別番号 000002934

住所 大阪府中央区道修町四丁目1番1号

氏名 たけだやぐひんこうぎょうかぶしがいいしや
武田薬品工業株式会社

代表者 たけだ くにお
武田 國男

電話番号 03-3278-2235 (担当者 矢口)

3. 出願国名 PCT



(1,500円)

優先権証明願 (PCT)



特許庁長官殿

1. 事件の表示


平成11年特許願第4426号

2. 請求人

識別番号 000002934

住 所 大阪府中央区道修町四丁目1番1号

氏名 よりがな ただやくひんこうぎょうかぶしがいしや
武田薬品工業株式会社

代表者 ただ 武田 くに 國男 

電話番号 03-3278-2235 (担当者 矢口)

3. 出願国名 PCT



(1,500円)

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
 INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT
 (PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 2587WO0P	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/00024	International filing date (day/month/year) 06/01/2000	Priority date (day/month/year) 07/01/1999
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC Int. C1⁷ C07K14/47,C12P21/02,C12N15/12/(C12P21/02,C12R1:19)		
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.		

1.	This international preliminary examining report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.
<input type="checkbox"/>	This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of sheets.	
3.	This report contains indications relating to the following items: <div style="margin-left: 20px;"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application </div>

Date of submission of the demand 28/04/2000	Date of completion of this report 15/12/2000
Name and mailing address of the international preliminary examining authority: Japanese Patent Office (IPEA/JP) 4-3, Kasumigaseki 3-chome, Chiyoda-ku, TOKYO 100-8915 JAPAN	Authorized officer HONMA Natuko Telephon No. 03 3581 1101 3488

INTERNATIONAL PRELIMINARY
 EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/JP99/06283

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial

applicability; citations and explanations supporting such statement

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/JP00/00024

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).):

☒ International Filing Document as originally filed

Description, pages:

☐ as originally filed
☐ as received on _____ with letter of _____

Claims, No:

☐ as originally filed
☐ as received on _____ with letter of _____

Drawings No:

☐ as originally filed
☐ as received on _____ with letter of _____

Sequence Listing

☐ as originally filed
☐ as received on _____ with letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3 (b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:
- ☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2c):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/JP00/00024

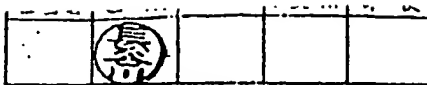
V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	<u>1-9</u>
	No:	Claims	<u>10</u>
Inventive Step (IS)	Yes:	Claims	<u> </u>
	No:	Claims	<u>1-10</u>
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	<u>1-10</u>
	No:	Claims	<u> </u>

2. Citations and explanations

Claim 10 lacks novelty in view of Reference 1 (WO98/14582, A) cited in the International Search Report .
Claim 10 is not materially different from the MPIF-1 described in Reference 1. Claim 1 through 9 lack inventive step in view of Reference 1, Reference 2 (JP 9-26093, A), and Reference 3 (EP 586872, A1) cited in the International Search Report. References 2 and 3 state that metal salts such as copper, zinc, and magnesium may be brought into contact to activate genetically engineered proteins (enzymes) as in Claims 1 through 10 . One having ordinary skill in the art could readily have thought of applying the techniques for activating genetically engineered proteins described in References 2 and 3 in order to obtain active proteins from the genetically produced MPIF-1 described in Reference 1



特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒 532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85
武田薬品工業株式会社知的財産部

PCT Written Opinion

00.9.18

PCT見解書

(法第13条)
[PCT規則66]

受付

00.7.19

知的財産部

発送日
(日.月.年)

18.07.00

出願人又は代理人
の書類記号

2587WOOP

応答期間

上記発送日から 2 月以内

国際出願番号

PCT/JPO0/00024

国際出願日

(日.月.年)

06.01.00

優先日

(日.月.年)

07.01.99

国際特許分類 (IPC) Int. Cl. C07K14/47, C12P21/02, C12N15/12//
(C12P21/02, C12R1:19)

出願人 (氏名又は名称)

武田薬品工業株式会社

1. これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。

2. この見解書は、次の内容を含む。

I ☒ 見解の基礎II ☐ 優先権III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成IV ☐ 発明の単一性の欠如V ☒ 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明VI ☐ ある種の引用文献VII ☐ 国際出願の不備VIII ☐ 国際出願に対する意見

3. 出願人は、この見解書に応答することが求められる。

いつ?

上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合に限りであることに注意されたい。

どのように?

法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。

なお

補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。

応答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。

4. 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 07.05.01 である。

名称及びあて先

日本国特許庁 (IPEA/JPO)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子


4N

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

様式PCT/IPEA/408 (表紙) (1998年7月)

(添付用紙の注意書きを参照)

担当者	G・M		Pat・M	部長
				

特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

高橋 秀一

殿

あて名

〒 532-0024

大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85
武田薬品工業株式会社知的財産部

00.9.18

PCT見解書

(法第13条)
(PCT規則66)

受付

00.7.19

知的財産部

発送日
(日.月.年)

18.07.00

出願人又は代理人
の書類記号

2587WOOP

応答期間

上記発送日から 2 月以内

国際出願番号

PCT/JPO0/00024

国際出願日

(日.月.年) 06.01.00

優先日

(日.月.年) 07.01.99

国際特許分類 (IPC) Int. Cl. C07K14/47, C12P21/02, C12N15/12//
(C12P21/02, C12R1:19)

出願人 (氏名又は名称)

武田薬品工業株式会社

1. これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。

2. この見解書は、次の内容を含む。

I ☒ 見解の基礎

II ☐ 優先権

III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成

IV ☐ 発明の単一性の欠如

V ☒ 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

VI ☐ ある種の引用文献

VII ☐ 国際出願の不備

VIII ☐ 国際出願に対する意見

3. 出願人は、この見解書に回答することが求められる。

いつ? 上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合に限られることに注意されたい。

どのように? 法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。

なお 補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。

応答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。

4. 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 07.05.01 である。

名称及びあて先

日本国特許庁 (IPEA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子

4N 9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

様式PCT/IPEA/408 (表紙) (1998年7月)

(添付用紙の注意書きを参照)

1. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に回答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☒ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条（PCT規則66.2(a)(ii)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1-9	有
	請求の範囲	10	無
進歩性 (IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-10	無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-10	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明

特許請求の範囲の請求項10は、国際調査報告で引用された文献1 (W0, 98/1458 2, A) より新規性を有しない。特許請求の範囲請求項の請求項10について、上記文献1には、MP1F-1について記載されており、物質として差異がない。

特許請求の範囲の請求項1～9は、国際調査報告で引用された上記文献1、文献2 (JP, 9-262093, A)、文献3 (EP, 586872, A1) により進歩性を有しない。

特許請求の範囲の請求項1～10について、上記文献2及び3には、遺伝子工学的に製造された蛋白質（酵素）を活性化させるために銅、亜鉛、マグネシウム等の金属塩を接触させる旨記載されている。上記文献1に記載のMP1F-1蛋白質を遺伝子工学的に製造し該蛋白質の活性化物を得るために、上記文献2～3に記載の遺伝子工学的に製造した蛋白質を活性化させる技術を適用することは、当業者が容易に想到することであると認められる。

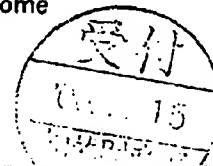
PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON


Date of mailing (day/month/year) 26 January 2000 (26.01.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 2587WO0P	International application No. PCT/JP00/00024

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. (for all designated States except US)
ITO, Takashi et al (for US)

International filing date : 06 January 2000 (06.01.00)
Priority date(s) claimed : 07 January 1999 (07.01.99)
11 January 1999 (11.01.99)

Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 21 January 2000 (21.01.00)

List of designated Offices :

AP : GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW
EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM
EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG
National : AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, ZA

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
☒ confirmation of precautionary designations
☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: Y. KUWAHARA
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1986 and 6 September 1987, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1986 and 6 September 1987, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 13 July 2000 (13.07.00)		IMPORTANT INFORMATION	
Applicant's or agent's file reference 2587WOOP			
International application No. PCT/JP00/00024	International filing date (day/month/year) 06 January 2000 (06.01.00)	Priority date (day/month/year) 07 January 1999 (07.01.99)	
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al			

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP : GH,GM,KE,LS,MW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW
EP : AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE
National : AU,BG,BR,CA,CN,CZ,IL,JP,KR,MN,NO,NZ,PL,RO,RU,SK,US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA : AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM
OA : BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG
National : AE,AL,AM,AZ,BA,BB,BY,CR,CU,DM,EE,GD,GE,HR,HU,ID,IN,IS,KG,KZ,LC,
LK,LR,LT,LV,MA,MD,MG,MK,MX,SG,SI,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UZ,VN,YU,ZA

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

PCT

**NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT**

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome,
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON

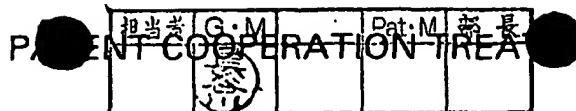


Date of mailing (day/month/year) 13 March 2000 (13.03.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 2587WO0P	
International application No. PCT/JP00/00024	International filing date (day/month/year) 06 January 2000 (06.01.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 07 January 1999 (07.01.99)
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
07 Janu 1999 (07.01.99)	11/1840	JP	29 Febr 2000 (29.02.00)
11 Janu 1999 (11.01.99)	11/4426	JP	29 Febr 2000 (29.02.00)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer Taïeb Akremi Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---



From the INTERNATIONAL BUREAU

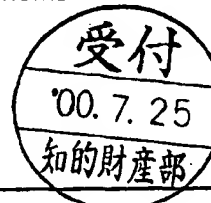
PCT

**NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES**

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 13 July 2000 (13.07.00)		
Applicant's or agent's file reference 2587WO0P		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP00/00024	International filing date (day/month/year) 06 January 2000 (06.01.00)	Priority date (day/month/year) 07 January 1999 (07.01.99)
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU,CN,JP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE,AL,AM,AP,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CR,CU,CZ,DM,EA,EE,EP,GD,GE,HR,HU,ID,IL,IN,IS,KG,
KZ,LC,LK,LR,LT,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MX,NO,NZ,OA,PL,RO,RU,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,
UA,UZ,VN,YU,ZA

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
13 July 2000 (13.07.00) under No. WO 00/40610

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau (WIPO) 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

117
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 2587WO0P	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/00024	International filing date (day/month/year) 06 January 2000 (06.01.00)	Priority date (day/month/year) 07 January 1999 (07.01.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14/47, C12P 21/02, C12N 15/12 // (C12P 21/02, C12R 1:19)		
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 28 April 2000 (28.04.00)	Date of completion of this report 15 December 2000 (15.12.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/00024

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

☒ the international application as originally filed☐ the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☐ the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☐ the drawings:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

☐ the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in written form.☐ filed together with the international application in computer readable form.☐ furnished subsequently to this Authority in written form.☒ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:☐ the description, pages _____☐ the claims, Nos. _____☐ the drawings, sheets/fig _____5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/00024

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-9	YES
	Claims	10	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-10	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-10	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Based on document 1 (WO, 98/14582, A) cited in the international search report, the subject matter of Claim 10 does not appear to be novel. Document 1 describes the MPIF-1 set forth in Claim 10, and these substances are one and the same.

Based on document 1, document 2 (JP, 9-262093, A) and document 3 (EP, 586872, A1) cited in the international search report, the subject matter of Claims 1-9 does not appear to involve an inventive step.

With respect to Claims 1-10, documents 2 and 3 state that for activation of a protein (enzyme) produced by genetic engineering, it is brought into contact with the salt of a metal such as copper, zinc, magnesium, and the like. Persons skilled in the art can easily conceive of applying the technology of producing the MPIF-1 protein described in document 1 and activating this protein produced by genetic engineering as described in documents 2 and 3 to obtain an activated protein.

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT
(PCT Article 36 and Rule 70)

3

Applicant's or agent's file reference 2587WO0P	FOR FURTHER ACTION		See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/JP00/00024	International filing date (day/month/year) 06/01/2000	Priority date (day/month/year) 07/01/1999	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC Int. C1⁷ C07K14/47, C12P21/02, C12N15/12/(C12P21/02, C12R1:19)			
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.			

1.	This international preliminary examining report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2.	This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.
<input type="checkbox"/>	This report is also accompanied by ANNEAXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 807 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of sheets.	
3.	This report contains indications relating to the following items:
I	<input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report
II	<input type="checkbox"/> Priority
III	<input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV	<input type="checkbox"/> Lack of unity of invention
V	<input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI	<input type="checkbox"/> Certain documents cited
VII	<input type="checkbox"/> Certain defects in the international application
VIII	<input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 28/04/2000	Date of completion of this report 15/12/2000
Name and mailing address of the international preliminary examining authority: Japanese Patent Office (IPEA/JP) 4-3, Kasumigaseki 3-chome, Chiyoda-ku, TOKYO 100-8915 JAPAN	Authorized officer HONMA Natuko Telephone No. 03 3581 1101 3488

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

International application No. PCT/JP99/06283

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
(PCT18条、PCT規則43、44)

#4-1

出願人又は代理人 の書類記号 2587WOOP	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JPO0/00024	国際出願日 (日.月.年) 06.01.00	優先日 (日.月.年) 07.01.99	
出願人(氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☒ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

#4-2

国際調査報告		国際出願番号・PCT/JP00/00024	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. C07K14/47, C12P21/02, C12N15/12 // (C12P21/02, C12R1:19)			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. C07K14/47, C12P21/02, C12N15/12			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使った電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) SwissProt/PIR/GeneSeq, BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X/Y	WO, 98/14582, A (GENOME SCIENCES, INC.) 9. 4月. 1998 (09. 04. 98) & EP, 941330, A1	10 /1-9	
Y	JP, 9-262093, A (武田薬品工業株式会社) 7. 10月. 1997 (07. 10. 97) ファミリーなし	1-10	
Y	EP, 586872, A1 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 16. 3月. 1994 (16. 03. 94) & US, 5434067, A & JP, 6-153938, A	1-10	
P Y	JP, 11-266865, A (積水化学工業株式会社) 5. 10月. 1999 (05. 10. 99) ファミリーなし	1-10	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 30. 03. 00		国際調査報告の発送日 11.04.00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 新見 浩一 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

特許協力条約

組長	G・M	Pat・M	部長

2

発行人 日本国特許庁 (受理官庁)

出願人代理人

高橋 秀一

あて名

〒532-0024

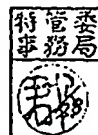
大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85
武田薬品工業株式会社知的財産部

PCT/JP00/00024

RO105

P C T

FILING RECEIPT



国際出願番号及び
国際出願日の通知書

(法施行規則第22条、第23条)
(PCT規則20.5(c))

#5

出願人又は代理人 書類記号 2587WOOP		発送日 (日. 月. 年) 18. 01. 00
国際出願番号 PCT/JP00/00024	国際出願日 (日. 月. 年) 06. 01. 00	優先日 (日. 月. 年) 07. 01. 99
出願人 (氏名又は名称) 武田薬品工業株式会社		

1. この国際出願は、上記の国際出願番号及び国際出願日が付与されたことを通知する。

記録原本は、18日01月00年に国際事務局に送付した。

注 意

- 国際出願番号は、特許協力条約を表示する「PCT」の文字、斜線、受理官庁を表示する2文字コード (日本の場合JP)、西暦年の最後から2桁の数字、斜線、及び5桁の数字からなっています。
- 国際出願日は、「特許協力条約に基づく国際出願に関する法律」第4条第1項の要件を満たした国際出願に付与されます。
- あて名等を変更したときは、速やかにあて名の変更届等を提出して下さい。
- 電子計算機による漢字処理のため、漢字の一部を当用漢字、又は、仮名に置き換えて表現してある場合もありますので御了承下さい。
- この通知に記載された出願人のあて名、氏名 (名称) に誤りがあるときは申出により訂正します。
- 国際事務局は、受理官庁から記録原本を受領した場合には、出願人にその旨を速やかに通知 (様式PCT/IB/301) する。記録原本を優先日から14箇月が満了しても受領していないときは、国際事務局は出願人にその旨を通知する。〔PCT規則22.1(c)〕

名称及びあて名 日本国特許庁 (RO/JP) 郵便番号 100-8915 TEL 03-3592-1308 日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 様式PCT/RO/105 (1998年7月)	権限のある職員 特許庁長官
---	------------------

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/JP00/00024

7

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF RECORD COPY

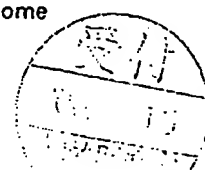
(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON

#6



Date of mailing (day/month/year) 26 January 2000 (26.01.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 2587WO0P	International application No. PCT/JP00/00024

The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. (for all designated States except US)
ITO, Takashi et al (for US)

International filing date : 06 January 2000 (06.01.00)
Priority date(s) claimed : 07 January 1999 (07.01.99)
11 January 1999 (11.01.99)

Date of receipt of the record copy
by the International Bureau : 21 January 2000 (21.01.00)

List of designated Offices :

AP : GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW
EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM
EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG
National : AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, ZA

ATTENTION

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
- ☒ confirmation of precautionary designations
- ☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer: Y. KUWAHARA
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

TAKAHASHI, Shuichi
Osaka Plant of Takeda Chemical
Industries, Ltd.
17-85, Jusohonmachi 2-chome,
Yodogawa-ku
Osaka-shi
Osaka 532-0024
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 13 March 2000 (13.03.00)	
Applicant's or agent's file reference 2587WO0P	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/00024	International filing date (day/month/year) 06 January 2000 (06.01.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 07 January 1999 (07.01.99)
Applicant TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD. et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
07 Janu 1999 (07.01.99)	11/1840	JP	29 Febr 2000 (29.02.00)
11 Janu 1999 (11.01.99)	11/4426	JP	29 Febr 2000 (29.02.00)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Taïeb Akremi
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38